

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

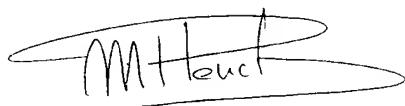
28 JUIL. 2000

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.A) OU B))

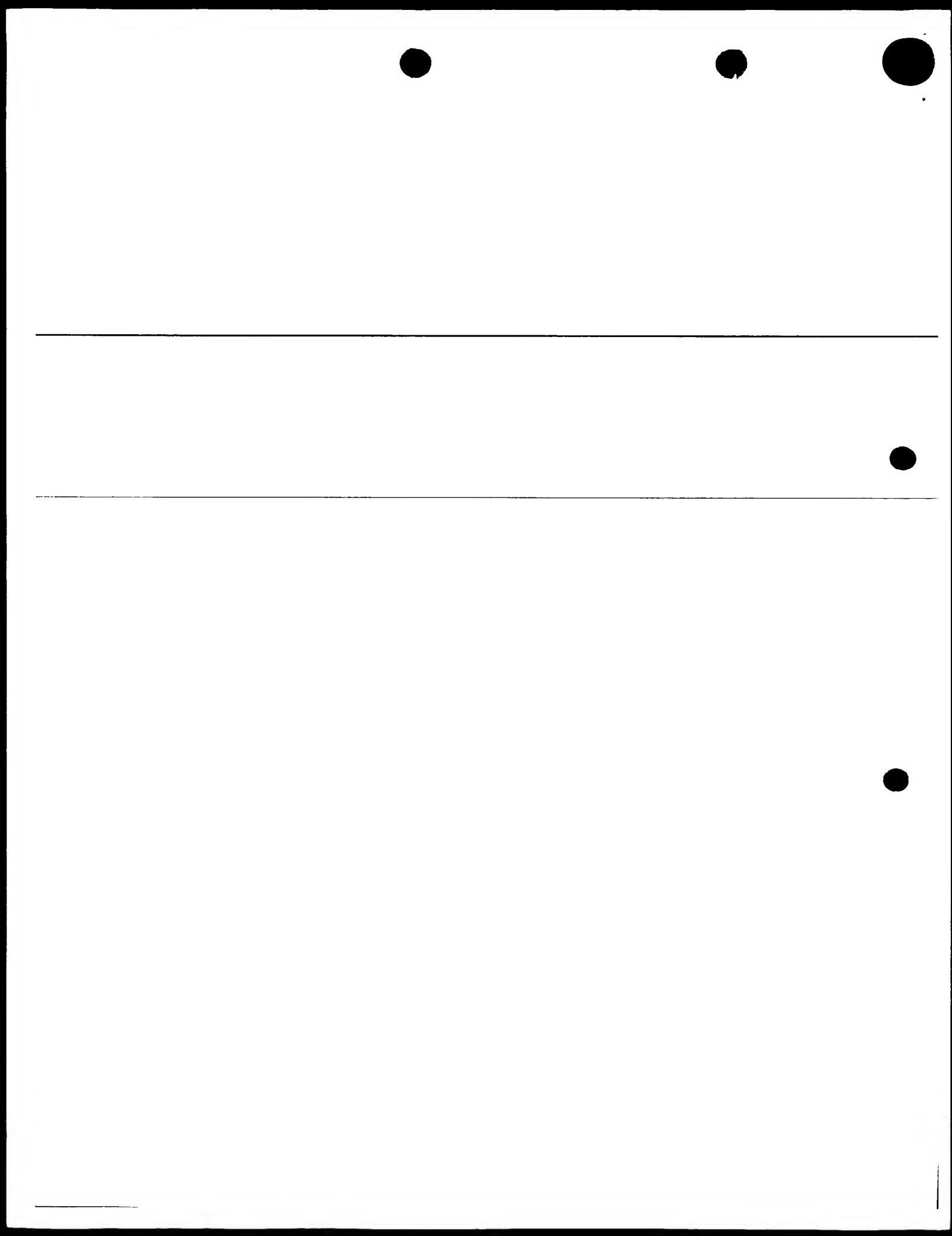


Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone 01 53 04 53 04
Télécopie 01 42 93 59 30



26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone : 01 53 04 53 04 Telecopie : 01 42 93 59 30

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Reserve a l'INPI

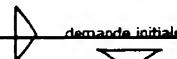
DATE DE REMISE DES PIÈCES	1 JUIL 1999
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL	9908504
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT	75 INPI PARIS B
DATE DE DÉPÔT	01 JUIL 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
A QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET REGIMBEAU
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen
 brevet d'invention certificat d'utilité n°



n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

237842 D10210 IIP 01 45 00 92 02

date

Établissement du rapport de recherche

diffère immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

Utilisation du gène Krit1 dans le domaine de l'angiogenèse

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Forme juridique

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

101, rue de Tolbiac 75013 PARIS

Pays

FR

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RECEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI


92-1001

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/1
(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 13 W 250899

Vos références pour ce dossier (facultatif) 237842 D18210 FEP	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 99 08504	

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Utilisation du gène Krit1 dans le domaine de l'angiogenèse

LE(S) DEMANDEUR(S) :

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) : 101, rue de Tolbiac 75013 PARIS - FRANCE

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom		TOURNIER-LASSERVE Elisabeth
Prénoms		
Adresse	Rue	26 bis rue Jouvenet - 75016 PARIS - FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		LABERGE LE COUTEUX Sophie
Prénoms		
Adresse	Rue	143 rue du Gros Horloge - 76000 ROUEN - FRANCE
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		LABAUGE Pierre
Prénoms		
Adresse	Rue	76 Résidence Clos Val Montferrand - 153 rue Sonja Hénie
	Code postal et ville	34090 MONTPELLIER - FRANCE
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
 92-1001		

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

Un changement apporte à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

ORIGINAL

5

La présente invention a pour objet une méthode de diagnostic des angiomes caverneux ou cavernomes pour la détection de mutations dans le gène *Krit1*. En particulier, cette détection est mise en œuvre au moyen de séquences nucléotidiques également objet de la présente invention. L'invention concerne 10 également l'utilisation de tout ou partie du gène *Krit1* à des fins thérapeutiques dans le domaine de la pro ou anti-angiogenèse.

Les cavernomes sont des malformations vasculaires le plus souvent localisées dans le système nerveux central mais également dans la rétine, le foie, les reins, etc.. et sont caractérisés par des cavités capillaires anormalement 15 élargies sans intervention du parenchyme cérébral (Russell et al.). Les symptômes cliniques comprennent des céphalées, des hémorragies, des crises d'épilepsie et des déficits neurologiques focaux. La prévalence des angiomes caverneux est proche de 0,5 % dans la population générale (Otten et al.). Ces angiomes peuvent être transmis de façon héréditaire sous une forme 20 autosomique dominante dans près de 50 % des cas (Rigamonti et al.). 3 localisations (ou loci) de malformations caverneuses cérébrales (CCM) ont été identifiées sur le bras long du chromosome 7, le bras court du chromosome 7 et le bras long du chromosome 3 (7q, 7p et 3q respectivement). Un important effet fondateur a été observé dans la population hispano-américaine, dans laquelle 25 toutes les familles étaient liées au locus *CCM1* localisé sur 7q (Rigamonti et al. ; Dubovsky et al. ; Günel et al. ; et Craig et al.).

Les inventeurs ont récemment établi les caractéristiques génétiques et cliniques des cavernomes, ainsi que les caractéristiques héréditaires dans une série de 57 familles françaises (Labauge et al.). Des investigations de neuro-imagerie ont confirmé la grande fréquence de lésions multiples dans les cavernomes héréditaires. Une corrélation hautement significative a également été mise en évidence entre le nombre de lésions et l'âge du patient, ce qui suggère fortement la nature dynamique de ces malformations vasculaires appelées également hamartomes. L'analyse de liaison génétique conduite dans 36 de ces familles a montré que 65 % d'entre elles étaient liées au locus *CCM1* avec aucun effet fondateur (Laberge et al.).

La taille de l'intervalle génétique contenant le locus *CCM1* avait été réduite en 1995 à 4 centimorgans, le locus *CCM1* étant encadré par D7S2410 et D7S689 (Johnson et al.). Au moyen essentiellement d'une approche *in silico*, les inventeurs ont établi une carte physique et transcriptionnelle de l'intervalle de *CCM1*. Parmi les 53 unités transcriptionnelles cartographiées à l'intérieur de la région critique, l'une d'elles correspondait à *Krit1*, un gène dont le produit interagit avec Rap1A (également appelé Krev1), un membre de la famille des gènes Ras impliqués dans la prolifération cellulaire, la différentiation et la morphogenèse (Bos et al.). En utilisant en combinaison la technique SSCP et le séquençage, les inventeurs ont identifié dans 8 familles *CCM1* non apparentées des mutations conduisant très probablement à une protéine *Krit1* tronquée. La coségrégation de ces mutations avec le phénotype affecté suggère fortement que *Krit1* est la protéine mutée dans les familles atteintes de cavernomes liés au locus *CCM1* et suggère l'implication de la voie de transduction du signal de Rap1A dans la vasculogénèse et/ou l'angiogénèse.

En utilisant un contig de YAC préalablement publié, et les bases de données de séquences publiques (The Washington University Chromosome 7 Project), les inventeurs ont construit des contigs de BAC/PAC couvrant 90 % de l'intervalle *CCM1*, estimé à 1 600 Kb (Figure 1). 20 familles comprenant 179

5 méioses potentiellement informatives et dont il avait été précédemment montré qu'elles avaient une probabilité *a posteriori* d'être liées au locus *CCM1* supérieure à 90 % ont été utilisées pour cartographier finement ce locus avec des marqueurs polymorphes identifiés au moyen des séquences BAC/PAC (Figure 1). Un événement de recombinaison observé chez un individu affecté (famille 27
10 ~~dans Labauge et al.~~) a permis aux inventeurs de réduire légèrement cet intervalle qui est maintenant encadré par M2456 (limite centromérique) et D7S689 (limite télomérique). Le criblage de banques de données publiques telles que Gene Map du Human Genome, Unigene et dBEST a permis aux inventeurs de cartographier à l'intérieur de cet intervalle 574 *Expressed Sequence Tags* (EST)
15 qui ont ensuite été regroupées en 53 unités transcriptionnelles putatives comprenant 6 gènes déjà connus : CDK6, HUMI.D14, KRIT1, PEX-1, mMTERF et Yotiao.

20 *Krit1* avait été identifié lors d'un criblage destiné à identifier les protéines interagissant avec Rap1A/Krev1, un membre de la famille des gènes Ras (Serebriiski et al.). Il code pour une protéine de 529 acides aminés qui comprend 4 domaines ankyrines et interagit avec Rap1A/Krev1 au moyen de sa région carboxyterminale. Il a déjà été indiqué que l'ARN messager de *Krit1* était exprimé à des niveaux faibles dans de nombreux tissus y compris le cerveau. Bien que la fonction exacte de *Krit1* soit encore inconnue, les inventeurs ont 25 considéré qu'il était un bon gène candidat pour *CCM1*, et ceci pour plusieurs raisons. Rap1A / Krev1A a été identifié sur la base de son homologie avec

Dras3, un homologue de Ras chez la drosophile, ainsi que sur la base de son activité anti-mitogène dans des fibroblastes transformés par K-ras (Pizon et al., 1988 / Kitayama et al., 1989). Bien que la pertinence physiologique de cet effet anti-mitogène observé *in vitro* n'ait pas encore été établie *in vivo*, ceci a conduit

5 à considérer que cette protéine était un antagoniste de Ras. Un rôle de la voie de signalisation de Ras dans la vasculogenèse et l'angiogenèse a été fortement suggéré par les anomalies vasculaires observées dans les modèles murins invalidés pour les protéines impliquées dans cette voie, par exemple les protéines raf ou GAP120 (Henkemeyer et al., 1995 ; Wojnowski et al., 1997). En plus de 10 ce rôle putatif en tant qu'antagoniste de Ras, Rap1A / Krev1 a été impliqué dans la différentiation cellulaire et la morphogenèse (Asha et al., 1999 ; Quarck et al., 1996 ; Pizon et al., 1988).

En d'autres termes, dans la mesure où la protéine Krit1 tronquée donne 15 lieu à une anomalie de l'angiogenèse s'accompagnant d'une prolifération des cellules endothéliales, il est raisonnable d'en déduire que le gène *Krit1* pourrait avoir un rôle de contrôle de l'angiogenèse.

Ainsi, dans le cadre de la présente invention, les inventeurs ont montré 20 que des mutations dans le gène *Krit1* susceptibles de donner lieu à une protéine Krit1 tronquée sont responsables de l'apparition d'anomalies vasculaires. Ces anomalies vasculaires peuvent affecter différents territoires incluant le cerveau et la peau et prendre différentes formes (cavernomes, angiomes capillaro-veineux). Le type des lésions observées (développement de maladies vasculaires anormales combiné à la nature des mutations observées (mutations entraînant une 25 troncation de la protéine) suggèrent fortement que cette protéine exerce un contrôle de l'angiogenèse qui pourrait être susceptible d'applications

thérapeutiques dans le domaine de l'antiangiogenèse, en particulier dans le domaine tumoral.

L'alignement de l'ADNc de *Krit1* avec le BAC AC000020, l'un des BAC localisé dans l'intervalle, a permis aux inventeurs de déterminer la structure

5 ~~génomique de *Krit1*. Ce gène est codé par 12 exons qui sont tous compris dans le BAC AC000020. Les inventeurs ont dessiné les amorces oligonucléotidiques introniques destinées à amplifier les exons (Tableau n° 1) ainsi que les séquences de jonction (Tableau n° 2). Ces amorces ont été particulièrement délicates à mettre au point en raison de la richesse en bases A et T de *Krit1* et sont très~~
10 ~~spécifiques de *Krit1*. Ainsi, la présente invention a pour objet une séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17,~~
15 ~~SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28.~~

Au moyen de ces amorces, les inventeurs ont pu amplifier tous les exons. Un ensemble de 20 patients CCM non apparentés appartenant à des familles 20 dans lesquelles l'analyse HOMOG a montré une probabilité *a posteriori* d'être liée au locus *CCM1* supérieure à 90 % a permis de procéder à des criblages de mutations par une analyse combinant une approche de type Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP), dans 4 conditions distinctes, et une approche de séquençage.

25 Les produits amplifiés de 8 de ces patients ont montré des variants de conformation anormaux qui n'ont été observés dans aucun des 50 sujets

contrôles. L'analyse de la séquence de ces amplimères a révélé des mutations hétérozygotes dans ces 8 patients (Tableau 3 et Figure 3). Ces mutations coscégrégeaient avec le phénotype malade dans les 8 familles de ces patients.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'au moins une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une mutation dans le gène *Krit1* ; de préférence une mutation liée à la survenue d'anomalies vasculaires telles que définies précédemment. De manière préférentielle, le prélèvement biologique est du sang.

Plus particulièrement, le pedigree 6 présente une délétion d'un A au nucléotide 1342, dans l'exon 10. Cette délétion conduit à un changement du cadre de lecture et ainsi à un codon stop prématué. Dans le pedigree 10, une substitution de C par T au nucléotide 1283 dans l'exon 10 conduit au remplacement d'une glutamine par un codon stop. Le pedigree 58 montre quant à lui l'insertion d'un C après le nucléotide 1271, également dans l'exon 10, ce qui entraîne un changement du cadre de lecture et un codon stop prématué. Le pedigree 41 montre une substitution de G par A au nucléotide 615 ce qui conduit au remplacement d'un tryptophane par un codon stop prématué dans l'exon 5. Le pedigree 42 présente une délétion de 4 pb (nucléotides 681-684) dans l'exon 6 donnant lieu à un codon stop prématué. Le pedigree 35 présente une délétion de 26 pb (nucléotides 1012-1037) à l'intérieur de l'exon 8 ; cette délétion causant un changement du cadre de lecture et un codon stop prématué au codon 332. Le pedigree 18 présente une insertion d'un C à l'intérieur de l'exon 2 après le nucléotide 247 ; cette insertion conduit à un changement du cadre de lecture et à un codon stop prématué. Le pedigree 19 montre une substitution d'un G par un A au nucléotide 261 ; celle-ci entraîne un changement de cadre de lecture ainsi qu'un codon stop prématué au codon 79.

Les analyses SSCP des membres affectés et non affectés ont montré la coségrégation parfaite des mutations avec le phénotype affecté dans chacun de ces 8 pedigrees (Figure 3).

Ainsi, les séquences nucléotidiques conformes à la présente invention 5 sont utilisées pour procéder à la détection d'une mutation dans au moins un exon du gène *Krit1*. Plus particulièrement, ces séquences nucléotidiques peuvent être utilisées par couple compte tenu de leur spécificité d'un exon selon la répartition suivante :

- SEQ ID N° 1 / SEQ ID N° 2 pour l'exon 1,
- 10 - SEQ ID N° 3 / SEQ ID N° 4 pour l'exon 2,
- SEQ ID N° 5 / SEQ ID N° 6 pour l'exon 3,
- SEQ ID N° 7 / SEQ ID N° 8 pour l'exon 4,
- SEQ ID N° 9 / SEQ ID N° 10 pour l'exon 5,
- SEQ ID N° 11 / SEQ ID N° 12 pour l'exon 6,
- 15 - SEQ ID N° 13 / SEQ ID N° 14 pour l'exon 7,
- SEQ ID N° 15 / SEQ ID N° 16 pour l'exon 8,
- SEQ ID N° 17 / SEQ ID N° 18 pour l'exon 9,
- SEQ ID N° 19 / SEQ ID N° 20 pour l'exon 10,
- SEQ ID N° 21 / SEQ ID N° 22 pour l'exon 10,
- 20 - SEQ ID N° 23 / SEQ ID N° 24 pour l'exon 11,
- SEQ ID N° 25 / SEQ ID N° 26 pour l'exon 12,
- SEQ ID N° 27 / SEQ ID N° 28 pour l'exon 12.

Avantageusement, la détection d'une mutation dans *Krit1* est précédée 25 de l'amplification de l'exon dans lequel la mutation est recherchée et cette amplification peut être réalisée par PCR ou PCR-like.

La nature tronquante de ces mutations, leur absence chez les contrôles sains et leur conségrégation avec le phénotype affecté suggère fortement qu'il s'agit de mutations délétères dans ces familles.

Les inventeurs n'ont pas détecté de variants de conformation anormaux de SSCP dans 12 des 20 familles testées. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ceci. La sensibilité de SSCP n'est pas de 100 % même lorsqu'on utilise plusieurs types de conditions comme cela a été le cas ici. De façon intéressante, aucun de ces variants de conformation anormaux n'a été observé dans le premier criblage qui a été réalisé à 20°C sans glycérol. De plus, les délétions qui emporteraient les régions contenant les séquences hybridant avec les amorces n'auraient pu être détectées par cette approche. Enfin, certaines de ces familles, bien que montrant une forte probabilité d'être liées au locus *CCM1*, pourraient en fait être liées à l'un des autres loci *CCM*.

La présente invention a également pour objet une méthode de diagnostic génotypique d'anomalies vasculaires chez un individu comprenant le prélèvement d'un échantillon biologique dudit individu ainsi que la détection de la présence d'une mutation dans le gène *Krit1* par analyse de la séquence d'acides nucléiques présents dans ledit échantillon, une telle mutation étant liée à la survenue d'anomalies vasculaires. La séquence d'acides nucléiques analysée peut être indifféremment de l'ADN génomique, de l'ADNc ou de l'ARNm. L'analyse peut être réalisée par hybridation, par séquençage ou par migration électrophorétique, en particulier par SSCP ou DGGE (Electrophorèse en gel en gradient dénaturant). La détection de ces mutations pourrait également être réalisée à l'aide d'une méthodologie permettant de détecter directement la présence de la protéine tronquée, par exemple les méthodes dites de Protein Truncation Test (traduction in vitro de transcrits reverse d'ADNc suivie d'une

révélation de la protéine par anticorps ou après marquage de la protéine à l'aide d'un acide aminé marqué). Enfin, la recherche de mutations peut être faite par analyse directe du transcript reverse d'ADNc préparé à partir des ARN totaux (en particulier provenant de cellules transformées par le virus EBV, cellules dans

5 lesquelles les auteurs ont montré l'expression du transcript de *Krit1*).

Avantageusement, tout ou partie de la séquence d'acides nucléiques correspondant au gène *Krit1* est amplifiée préalablement à la détection de la présence d'une mutation, cette amplification pouvant être réalisée par PCR ou PCR-like. De façon tout à fait préférentielle, cette amplification peut être 10 réalisée au moyen d'amorces choisies parmi les séquences d'acides nucléiques conformes à la présente inventio, par exemple utilisées selon la répartition ci-dessus mentionnée.

La question principale est donc de comprendre comment ces mutations ont pu conduire aux cavernomes. Peu de choses sont connues en réalité sur la 15 nature de ces lésions qui sont considérées comme des malformations vasculaires ou hamartomes. Il semblerait que la période d'apparition de ces malformations pendant la vie embryonnaire n'est pas tout à fait claire. De plus, dans certains cas, particulièrement dans les cas familiaux, l'extension évolutive de ces hamartomes a été décrite : il a été suggéré que ces lésions peuvent exprimer des 20 facteurs et/ou des récepteurs impliqués dans l'angiogenèse (Rothbart et al., 1996 ; Notelet et al., 1997).

Il convient d'indiquer que les inventeurs ont observé dans quatre familles (Labauge et al., 1999) que des malformations cutanées (également appelées angiomes) pouvaient ségrégner avec les cavernomes cérébraux.

Toutes les mutations rapportées ici conduiraient, si elles étaient traduites, à des protéines Krit1 tronquées qui seraient déletées de la région interagissant avec Rap1A / Krev1.

Les fonctions exactes de Rap1A / Krev1 ne sont pas tout à fait élucidées.

5 ~~Ce membre de la famille des Ras GTPase est exprimé de façon ubiquitaire~~ particulièrement dans les neutrophiles, les plaquettes et le cerveau ; il est localisé dans les compartiments endocytiques / lysosomiaux. Rap1A a été décrit comme interagissant avec B-Raf, ce qui est tout à fait intéressant au vu de l'apoptose massive endothéliale observée chez les souris déficientes pour B-Raf
10 (Wojnowski et al., 1997). In vivo, des études sur les eucaryotes inférieurs tels que les levures et la drosophile ont récemment donné quelques indications sur les fonctions de Rap1A dans la différentiation et la morphogenèse (Asha et al.).

15 L'interaction de Krit1 et de Rap1A suggère que Krit1 pourrait soit réguler Rap1A soit être un effecteur de Rap1A (Bos et al.). Les mutations rapportées ici pourraient résulter soit d'un effet dominant négatif soit d'une perte de fonction. L'observation des familles présentant des délétions complètes de Krit1 serait un argument fort en faveur de cette hypothèse. Par ailleurs le fait que les formes sporadiques de cavernomes se manifestent par une lésion unique et que les formes familiales se manifestent pas des lésions multiples suggère 20 fortement que ces lésions suivent la règle du « *double hit de Knudson* » (Knudson 1971) et qu'une perte complète de fonction de Krit1 pourrait être nécessaire à l'apparition des cavernomes.

25 En d'autres termes, dans les formes dominantes de la maladie, une première mutation, présente dans toutes les cellules de l'organisme à l'état hétérozygote, serait présente. L'apparition des lésions cavernomateuses serait conditionnée par la survenue d'une deuxième mutation touchant l'autre allèle de

ce gène, mutation qui surviendrait de façon somatique. Dans les formes sporadiques, l'individu ne présente aucune mutation germinale et la lésion unique résulterait de deux mutations survenues dans la même cellule.

En résumé, les données reportée ici, suggèrent fortement que les 5 mutations tronquantes de *Krit1* sont responsables de l'apparition des cavernomes cérébraux observés dans les familles *CCM1*, mettant en exergue le rôle putatif de la voie de signalisation de Rap1A dans ces mécanismes.

Parmi les applications thérapeutiques concernées par la présente invention, pourraient être concernées différents types de malformations 10 ~~vasculaires, dysplasies vasculaires, angiomes et/ou toute situation où existe une angiogenèse anormale.~~

Ainsi, la présente invention a également pour objet l'utilisation du gène *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène pour la préparation d'un médicament ou son utilisation dans une approche de type thérapie génique 15 destiné à contrôler ou inhiber l'angiogenèse.

Par « séquence dérivée de ce gène », on entend toute séquence ou partie de séquence normale ou mutée du gène *Krit1*.

La présente invention a également pour objet un vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée comportant la séquence du gène *krit1* ou une 20 séquence dérivée de ce gène (la séquence dérivée est définie ci-dessus). Dans le cas où l'on souhaiterait réprimer une angiogenèse anormale, il pourrait être intéressant de surexprimer la séquence en question et c'est la raison pour laquelle le vecteur conforme à l'invention comprend, avantageusement, les éléments nécessaires à cette surexpression.

25 En particulier, le vecteur conforme à l'invention peut être destiné à la thérapie génique et dans le cas où l'on souhaiterait limiter son site d'action, ce

vecteur peut comporter une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression tissu spécifique des séquences qu'il comprend.

Enfin, la présente invention a pour objet une composition thérapeutique comportant à titre de principe actif tout ou partie de la protéine *Krit1* normale ou modifiée, de façon à se substituer par exemple à une protéine tronquée et pallier la déficience. Le principe actif peut également être un vecteur tel que décrit précédemment.

La Figure 1 représente la carte génétique, physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*.

La Figure 1a représente la carte génétique du locus *CCM1*. Ce locus était précédemment défini par l'intervalle D7S2410-D7S689. Les intervalles génétiques réduits MS2456-D7S689 sont indiqués par des crochets horizontaux. Les microsatellites déjà publiés sont encadrés. Les nouveaux microsatellites sont identifiés par des caractères gras. Certains des STS sont également montrés. Le STS sWSS 1703 correspond aux nucléotides 393-658 de *Krit1*. Les marqueurs entre les crochets verticaux sont espacés de moins de 1 kb.

La Figure 1b représente la carte physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*. Des contigs de BAC sont répartis sur l'intervalle *CCM1*. Le BAC AC000120 est représenté par le trait le plus épais. Les chevauchements avec soit les STS, soit les marqueurs microsatellites sont indiqués par des petites barres verticales. La flèche noire correspond à *Krit1*, les flèches blanches correspondent à des gènes humains bien caractérisés et les flèches vides correspondent à des gènes présentant de fortes homologies avec des gènes d'autres espèces (non caractérisés chez les humains).

La **Figure 2** représente la coségrégation des variants de conformation avec le phénotype malade au sein de 8 pedigrees (SSCP).

Les symboles vides désignent les sujets dont l'examen du cerveau par IRM est normal, les symboles noirs à moitié pleins correspondent à des patients

5 asymptomatiques présentant des cavernomes sur l'examen par IRM, les symboles noirs pleins correspondent à des patients symptomatiques et présentant des cavernomes sur l'IRM ; le signe « ? » correspond aux sujets ayant un statut inconnu et le signe « \ » correspond à des patients décédés. Les patients décédés ou avec un statut inconnu n'ont pas été testés pour la mutation mais sont
10 ~~représentés pour une meilleure compréhension des structures familiales.~~ Les bandes anormales sont indiquées par une flèche.

La **Figure 3** illustre les mutations de *Krit1*.

La Figure 3a représente la structure du gène *Krit1* et de la protéine putative correspondante. « ns » signifie non-sens, « del » signifie délétion et
15 « ins » signifie insertion. Pour les insertions, le numéro de nucléotide correspond au nucléotide précédent l'insertion. L'expression « Krev Interacting Region » correspond à la région (acides aminés 483-529) dont la délétion abolit l'interaction avec Krev lors du test en double hybride dans la levure.

La Figure 3b représente les mutations de *Krit1*, identifiées dans les 8 pedigrees mentionnés plus haut. Les flèches indiquent les sites de mutation. WT signifie séquence de type sauvage et MT signifie séquence mutante. Dans le pedigree 42, le chromatogramme et la séquence présentés correspondent au brin négatif ; le brin positif a montré une superposition complète des séquences normales et anormales et ne permettaient pas d'avoir une bonne visualisation du site du début de la délétion.

EXEMPLES

MATERIELS ET METHODES

Patients

5 20 patients non apparentés appartenant à des familles dont on savait qu'elles présentaient de façon héréditaire des cavernomes ont fait partie de l'étude avec leur libre consentement (Labauge et al.).

10 L'analyse de ce panel de familles avec le test HOMOG a montré que ces familles avaient une probabilité *a posteriori* d'être liées au locus *CCM1* supérieure à 90 % (Laberge et al.).

15 Une approche combinant biologie moléculaire et bio informatique a été utilisée pour établir la carte physique et transcriptionnelle du locus *CCM1*. Après validation d'un contig de YACs préalablement publiée par Johnson et al. (1995), les auteurs ont positionné dans l'intervalle par PCR et par une approche *in silico* 574 EST (Expressed Sequence Tags) qu'ils ont regroupés en 53 groupes.

Réduction de l'intervalle génétique

20 12 marqueurs microsatellites polymorphes recouvrant l'intervalle D7S2410-D7S689 ont été sélectionnés pour les analyses de liaison. 7 d'entre eux étaient préalablement connus : D7S2410, D7S2409, D7S1813, D7S1789, D7S646, D7S689 et D7S558, et ont été utilisés par plusieurs équipes (Günel et al. dans *Neurosurgery*, Craig et al., Labauge et al., Laberge et al.). Les derniers MS65, MS2453A, MS2456A, MS119 et MS120 ont été identifiés par les inventeurs sur la base des données de séquence des BAC cartographiés dans l'intervalle.

Détection des mutations et identification

Sur la base de la comparaison des séquences de l'ADNc de *Krit1* et du BAC AC 00000120, les inventeurs ont déterminé 14 jeux d'amorces pour amplifier les 12 exons et les sites de jonction exon / intron de *Krit1* à partir de

5 l'ADN génomique. Des réactions de PCR ont été mises en œuvre comme suit : après une première étape initiale de dénaturation à 94°C (4 min), 30 cycles d'amplification consistant en des étapes à 94°C (15 s), une température d'hybridation optimisée comprise entre 45°C et 55°C (15s) et 72°C (15s) suivie par une étape d'extension finale à 72°C (10 min). Les produits de PCR ont été
10 soumis à une électrophorèse dans 4 types de conditions (acrylamide à 10 % avec ou sans glycérol à 4°C et 20°C) sur un appareil Mighty Small II (Pharmacia-Biogen) utilisé en condition de courant constant de 35 mA. Des variants de conformation ont été révélés à l'argent (Silver Stain Plus kit, Biorad). Des amplimères montrant un pattern de bandes SSCP atypiques ont été séquencés
15 (AB1377, Perkin Elmer). Toutes les mutations décelées lors du séquençage ont été testées pour leur coségrégation avec le phénotype malade par une approche SSCP.

TABLEAU 1 : AMORCES

EXON	AMORCE SENS	AMORCE REVERSE	TAILLE DE L'AMPLI-MERE
1	GAGCGGATAAAAACATAAT (SEQ ID N° 1)	GAGCTAAAATTCATTCAA (SEQ ID N° 2)	205
	GCTCTTAATGGGTTTTG (SEQ ID N° 3)	AGCAATGTGGAGTAAAAC (SEQ ID N° 4)	183
	TTTGGAAATGAGAACAGTC (SEQ ID N° 5)	GTCCTGTTGTATTTTCA (SEQ ID N° 6)	265
	GTTGTTGTTTTGTTTG (SEQ ID N° 7)	ACCTGGAAAATAACTTAC (SEQ ID N° 8)	208
	ATGTAATGCCTTTTCC (SEQ ID N° 9)	ATGCCTGGCTCTAACTAT (SEQ ID N° 10)	181
	TTGTTAGATTGTGATGTA (SEQ ID N° 11)	AACATAATAAAAACTTTC (SEQ ID N° 12)	257
	TTTATAAAAGGAATGATG (SEQ ID N° 13)	TCAACTCAAACCATATCA (SEQ ID N° 14)	335
	TGTAGCCTAATAACCAAA (SEQ ID N° 15)	AGCATAGCACAAGACCAT (SEQ ID N° 16)	243
	GGTGAAGTTTTAATATG (SEQ ID N° 17)	CAATAGTTATGAAGTCC (SEQ ID N° 18)	213
	ATATTACAAAGGCAAGC (SEQ ID N° 19)	TGACATGATTGGTAAAAA (SEQ ID N° 20)	180
	TGGTACATTTCTTCA (SEQ ID N° 21)	CTTTATGATTGCTGGGC (SEQ ID N° 22)	201
11	GGTGAAGTTTTAATATG (SEQ ID N° 23)	CAATAGTTATGAAGTCC (SEQ ID N° 24)	205
12	AATAGATAGGAACTGCC (SEQ ID N° 25)	GTGGCTTGAGTAACAGTT (SEQ ID N° 26)	234
	TAATGCCCACTGAAAGAA (SEQ ID N° 27)	GGCTGGTCTTGAACTCTG (SEQ ID N° 28)	199

TABLEAU 2 : SEQUENCES DES JONCTIONS INTRON-EXON

EXON	POSITION SUR L'ADNC	TAILLE	SEQUENCE	POSITION SUR BAC
1	8-133	126	atcaggtag ACAGAAA...TACA AATCGG gtaagatgg (SEQ ID N° 29)	AC000120 127165-127040
2	134-249	116	cccttttag GTAGATAAAG...CAGAAGACAA gtaactttc (SEQ ID N° 31)	126561-126445
3	250-393	144	taatgatttag GGAACGACAG...ATGCATGCTG gtaaatggaa (SEQ ID N° 33)	126228-126086
4	394-550	157	tttatacg GTATGGAAAA...AACGGATAGA gtaagtatt (SEQ ID N° 35)	118319-118163
5	551-657	107	acatttttag CATATAACAG...TAA CAAAACCA gtaagaattta (SEQ ID N° 37)	117464-117357
6	658-815	157	ttctttag TATGAAAAAG...GAA AACCTCA gtaagaatgt (SEQ ID N° 39)	114615-114459
7	816-967	152	tgttttag GCCTTCAACT...TGAAAACAG gttttcttgg (SEQ ID N° 41)	113690-113539
8	968-1134	168	tcccttaag ATTGAAAGACC...GTTTCCCTAA gtaagtattt (SEQ ID N° 43)	106414-106248
9	1135-1222	88	ggcttacag TGAAGAAAAT...TGAATACAAAG gtaagcttt (SEQ ID N° 45)	105616-105529
10	1223-1429	207	tgttttag AATCTCAGTA...GAAACTAAG gtagatttc (SEQ ID N° 47)	105038-104832
11	1430-1546	117	tatgtttag GCTTTACTCA...TACAAAACAG gtaatgtca (SEQ ID N° 49)	93060-92942
12	1547-2004*	458*	tacttttag GCTCTGGTCG... (SEQ ID N° 51)	92441-91984*

* Exon 12 non entièrement déterminé car contient des séquences *Alu*

TABLEAU 3 : MUTATIONS DANS KRIT1

PEDIGREE	MUTATIONS DANS L'ADN GENOMIQUE	MUTATIONS DANS	MUTATIONS DES ACIDES AMINÉS
6	Délétion (A) nt 1342 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 438	Normal (WT): IF (438) TKASPSNHKVTPVIVG... Mutant (MT): IF (438) TIRTAPIKSSLM*stop codon
10	Faux-sens (C → T) nt 1283 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 420	WT : FL (420) QN... MT : FL (420) * stop codon
18	Insertion (C) après nt 247 Exon 2	Changements en acides aminés après AA 420	WT : ED (74) KERQWDD... MT : ED (74) QGTTTVGR* stop codon
19	Faux-sens (G → A) nt 261 Exon 3	Changements en acides aminés après AA 74	WT : RQ (79) WVDD... MT : RQ (79) * stop codon
35	Délétion (26 pb) nt 1012 Exon 8	Changements en acides aminés après AA 328	WT : EA (328) RYNLLKGFYTAPDAKL... MT : EA (328) SSS* stop codon
41	Faux-sens (G → A) nt 615 Exon 5	Changements en acides aminés après AA 197	WT : NN (197) WEEAA... MT : NN (197) * stop codon
42	Délétion (GAAT) nt 681-684 Exon 6	Changements en acides aminés après AA 217	WT : IV (217) RMDDGSYRSVELK... MT : IV (217) RMGHIVLLN* stop codon
58	Insertion (C) après nt 1271 Exon 10	Changements en acides aminés après AA 415	WT : LQ (415) RMFLQNCQITTKASPSNHKV... MT : LQ (415) HVLTQLTIDKGYKPQQS* stop codon

LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE - INSERM

<120> D18210

<130> Utilisation du gène *Krit1* dans le domaine de l'angiogenèse

<140>

<141>

<160> 51

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce sens

<400> 1

gagcggataa aaactaat

18

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce reverse

<400> 2

gagctaaaat tcattcaa

18

<210> 3

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce sens

<400> 3

gctcttaatg gtttttg

18

<210> 4

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce reverse

<400> 4

agcaatgtgg agtaaaac

18

<210> 5
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 5

tttggaaatga gaacagtc

18

<210> 6
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 6

gtcctgttgtt atttttca

18

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 7

gttggttttt tttgtttg

18

<210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 8

acctggaaaa taacttac

18

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 9

atgtaatgcc ttttttcc

18

<210> 10

<211> 18

<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 10
atgcctggct ctaactat

18

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 11
ttgttagatt gtgatgta

18

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 12
aacataataa aaacttcc

18

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 13
tttataaaag gaatgatg

18

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 14
tcaactcaaa ccatatca

18

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 15
tgttagcctaa taacccaaa 18

<210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 16
agcatagcac aagaccat 18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 17
ggtaaagg ttaatatg 18

<210> 18
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 18
caatagttt tgaagtcc 18

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 19
atatttacaa aggcaagc 18

<210> 20
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 20
tgacatgatt ggtaaaaa 18

<210> 21
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 21
tggcacattt tcctttca 18

<210> 22
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 22
ctttagtattt gctggggc 18

<210> 23
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 23
ggtaatgttt ttaatatg 18

<210> 24
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 24
caatagttt tgaagtcc 18

<210> 25
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 25
aatagatagg gaactgcc 18

<210> 26
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 26
gtggcttgag taacagtt

18

<210> 27
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce sens

<400> 27
taatgccccac tgaaaagaa

18

<210> 28
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Amorce reverse

<400> 28
ggctggtctt gaactctg

18

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 29
atcaggtcag acagaaaact

20

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30
tacaaatcgg gtaagagttg

20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 31
ccctttctag gtagataaag

20

<210> 32

<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 32
cagaagacaa gtactgttcc

20

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 33
taatgattag ggaacgacag

20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 34
atgcatgctg gtaaatggaa

20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 35
tttatacag gtatggaaaa

20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 36
aacggataga gtaagttatt

20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 37
acatttctag catataacag

20

<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 38
taacaaacca gtaagaatta

20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 39

tttctttag tataaaaag

20

<210> 40

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 40

gaaaacctca gtaagaaagt

20

<210> 41

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 41

tgttttcaag gccttcaact

20

<210> 42

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 42

tgaaaaacag gtttgcttgg

20

<210> 43

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 43

ttcccttaag attgaagacc

20

<210> 44

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 44

gttcctaaa gtaagtat

20

<210> 45

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 45

tgcttacag tgaagaaat

20

<210> 46

<211> 20

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 46	
tgaataacaag gtaagctgtt	20
<210> 47	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 47	
<u>ttqtttttag aatctcagta</u>	20
<hr/>	
<210> 48	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 48	
ggaaactaag gtagatttc	20
<hr/>	
<210> 49	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 49	
<u>tatgttgcag gctttactca</u>	20
<hr/>	
<210> 50	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 50	
tacaaaacag gtaagtatca	20
<hr/>	
<210> 51	
<211> 20	
<212> ADN	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
<u>tactttgttag gctctggtcg</u>	20

REFERENCES

1. Altschul, S.F., Madden T.L., Schaffer A. A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST : a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25** : 3389-3402. (1997)
2. Asha H., de Ruiter N.D., Wang M.G. and Hariharan I.K. The Rap1 GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO*, **18** : 605-615 (1999)
3. Bos J.L. All in the family? New insights and questions regarding interconnectivity of Ras, Rap1 and Ral. *EMBO*, **17** : 6776-6782 (1998)
4. Craig H.D., Günel M., Cepada O. et al. Multilocus linkage identifies two new loci for a Mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p1(-13 and 3q25.2-27. *Hum Mol Genet* **7** : 1851-1858. (1998)
5. Dubovsky J., Zabramsky J.M., Kurth J. et al. A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. *Hum Mol Genet* **4** : 453-458. (1995)
6. Ducros A., Denier C., Joutel A. et al. Recurrence of the T666M Calcium Channel CACNA1A Gene Mutation in Familial Hemiplegic Migraine with Progressive Cerebellar Ataxia. *Am J Hum Genet*, **64** : 89-98. (1999)
7. Eenson DA, Boguski MS, Lipman DJ et al. GenBank. *Nucleic Acids Res* **27** :12-7 (1999)
8. Günel M., Awad I.A., Finberg K.S. et al. A Founder Mutation as a cause of cerebral cavernous malformation in Hispanic Americans. *N Eng J Med* **334** : 946-951. (1996)
9. Günel M, Awad IA, Finberg K et al. Genetic heterogeneity of inherited cerebral cavernous malformation. *Neurosurgery* **38** : 1265-1271. (1996)

10. Henkemeyer M., Rossi D.J., Holmyard D.P. et al. Vascular system defects and neuronal apoptosis in mice lacking ras GTPase-activating protein. *Nature* 377 : 695-701. (1995)
11. Huang X., Adams M.D., Zhou H. and Kerlavage A.R. A tool for analysing and annotating genomic sequences *Genomics* 40 : 37-45 (1997)
12. Johnson EW, Iyer LM, Rich SS et al. Refined Localization of the Cerebral Cavernous Malformation Gene (CCM1) to a 4 cM Interval of Chromosome 7q Contained in a Well-defined YAC Contig. *Genome Research*, 5 : 368-380. (1995)
- 10 13. Kiayama H., Sugimoto Y., Matsuzaki T., Ikawa Y and Noda M. A ras-related gene with Transformation Suppressor Activity. *Cell*, 56 : 77-84 (1989)
14. Knudson AG Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma; *Proc. Nat. Ac. Sci. USA* 68, 820-823 (1971).
- 15 15. Labauge P., Laberge S., Brunereau L. et al. Hereditary cerebral cavernous angiomas : clinical and genetic features in 57 French families. *Lancet* 352 : 1892-258. (1998)
- 20 16. Laberge S., Labauge P., Maréchal E., Maciazeck J., Tournier-Lasserve E. Genetic heterogeneity and absence of founder effect in a series of 36 non Hispano-American cerebral cavernomas families. (European Journal of Human Genetics, in press)
17. Notelet L., Houtteville J.P., Khoury S., Lechevalier B. and Chapon F. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in cerebral cavernomas : an immunocytochemical study of 42 cases. *Surg Neurol* 47 : 364-70 (1997)

18. Oten P, Pizzolata GP, Rilliet B, Berney J. A propos de 131 cas d'angiomes caverneux (cavernomes) du SNC, repérés par l'analyse rétrospective de 24 535 autopsies. *Neurochirurgie* 35 :82-83 (1989)
19. Pizon V., Chardin P., Lerosey I., Olofsson B. and Tavitian A. Human 5 cDNAs rap1 and rap2 homologous to the *Drosophila* gene Dras3 encode proteins closely related to ras in the effector region. *Oncogene*, 3 : 201-204 (1988)
20. Pizon V., Cifuentes-Diaz C., Mege RM., Baldacci G. and Rieger F. Expression and localization of Rap1 proteins during myogenic 10 differentiation. *Eur J Cell Biol*, 69 : 224-235 (1996)
21. Quarck R., Berrou E., Magnier C., Bobe R., Bredoux R., Tobelem G., Enouf E and Bryckaert M. Differential up-regulation of Rap1a and Rap1b proteins during smooth muscle cell cycle. *Eur J Cell Biol* 70 : 269-277 (1996)
22. Rigamonti D, Hadley MN, Drayer BP et al. Cerebral cavernous 15 malformations. Incidence and familial occurrence. *N Engl J Med* 319 : 343-347. (1988)
23. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386 : 671-674. (1997)
24. Russell DS, Rubenstein LJ. Pathology of tumours of the nervous system. 5th 20 ed. Baltimore, Md ; Williams and Wilkins :730-736. (1989)
25. Rothbart D., Awad I.A., Lee J., Kim J., Harbaugh R., Crisculo G.R. Expression of Angiogenic Factors and Structural Proteins in Central Nervous System Vascular Malformations. *Neurosurgery* 38 : 915-925 (1996)
26. Rozen S., Skaletsky H.J. Primer 3 25

http://www.genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html (1996, 1997)

27. Serebriiskii L., Estojak J., Sonoda G. et al. Association of Krev1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping

5 to 7q21-22 *Oncongene* **15** : 1043-1049. (1997)

28. Wojnowski L., Zimmer A.M., Beck T.W. et al. Endothelial apoptosis in Braf-deficient mice. *Nature Genet* **16** : 293-297. (1997)

29. Xu HP., Wang Y., Riggs M., Rodgers L. and Wigler M. Biological activity of the mammalian RAP genes in yeast. *Cell Regul* **1** :763-9 (1990)

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant SEQ ID N° 1,
5 SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6,
SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11,
SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°
16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID
10 N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ
ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28.
2. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 1,
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une
mutation dans le gène *Krit1*.
15
3. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 2,
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une
mutation dans le gène *Krit1*, liée à la survenue de cavernomes.
- 20 4. Utilisation selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisée en ce que la
détection de la mutation est effectuée dans au moins un exon du gène *Krit1*.
5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée par le fait qu'un couple de
séquences est spécifique d'un exon selon la répartition suivante :
25 - SEQ ID N° 1 / SEQ ID N° 2 pour l'exon 1,
- SEQ ID N° 3 / SEQ ID N° 4 pour l'exon 2,

- SEQ ID N° 5 / SEQ ID N° 6 pour l'exon 3,
- SEQ ID N° 7 / SEQ ID N° 8 pour l'exon 4,
- SEQ ID N° 9 / SEQ ID N° 10 pour l'exon 5,
- SEQ ID N° 11 / SEQ ID N° 12 pour l'exon 6,

5 - SEQ ID N° 13 / SEQ ID N° 14 pour l'exon 7,

- SEQ ID N° 15 / SEQ ID N° 16 pour l'exon 8,
- SEQ ID N° 17 / SEQ ID N° 18 pour l'exon 9,
- SEQ ID N° 19 / SEQ ID N° 20 pour l'exon 10,
- SEQ ID N° 21 / SEQ ID N° 22 pour l'exon 10,
- 10 - SEQ ID N° 23 / SEQ ID N° 24 pour l'exon 11,
- SEQ ID N° 25 / SEQ ID N° 26 pour l'exon 12,
- SEQ ID N° 27 / SEQ ID N° 28 pour l'exon 12.

6. Utilisation selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée par le fait que la
15 détection d'une mutation est précédée de l'amplification de l'exon dans
lequel la mutation est recherchée.

7. Utilisation selon la revendication 6, caractérisée par le fait que l'amplification
est réalisée par PCR ou PCR-like.

20 8. Méthode de diagnostic génotypique de cavernomes chez un individu,
caractérisé par le fait que l'on prélève un échantillon biologique dudit
individu, que l'on détecte la présence d'une mutation dans le gène *Krit1*, par
analyse de la séquence nucléique présente dans ledit échantillon, une telle
25 mutation étant liée à la survenue de cavernomes.

9. Méthode de diagnostic selon la revendication 8, caractérisée par le fait que la séquence d'acide nucléique est de l'ADN génomique, de l'ADNc ou de l'ARNm.

- 5 10. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par hybridation.
11. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 à 10, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par séquençage.

- 10 12. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par migration électrophorétique, et plus particulièrement par SSCP ou DGGE.
- 15 13. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 et 9, caractérisée par le fait que ladite analyse est réalisée par une méthodologie visant à détecter la troncation d'une protéine.
14. Méthode de diagnostic selon l'une des revendications 8 à 13, caractérisée par le fait que tout ou partie de la séquence d'acide nucléique correspondant au gène *Krit1* est amplifiée préalablement à la détection de la présence d'une mutation.

- 20 25 15. Méthode de diagnostic selon la revendication 14, caractérisée par le fait que l'amplification est réalisée par PCR ou PCR-like.

Feuille avant rectification

Feuille avant rectification

16. Méthode de diagnostic selon la revendication 15, caractérisée par le fait que les amorces pour réaliser l'amplification sont parmi les séquences définies dans la revendication 1, de préférence dans la revendication 4.

5 17. Utilisation du gène *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler ou inhiber l'angiogenèse.

18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le médicament est destiné à la thérapie génique.

10

19. Vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence du gène *Krit1* ou une séquence dérivée de ce gène.

15 20. Vecteur d'expression selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires à la surexpression de la séquence.

21. Vecteur selon les revendications 19 ou 20, destiné à une utilisation selon l'une des revendications 17 et 18.

20

22. Vecteur selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression tissu spécifique.

23. Composition thérapeutique caractérisée en ce qu'elle comporte à titre de principe actif au moins tout ou partie de la protéine Krit1 normale ou modifiée.

5 24. Composition selon la revendication 23, caractérisée en ce que le composé est un vecteur selon l'une des revendications 19 à 22.

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIETE INDUSTRIELLE
26, Avenue Kléber
75116 PARIS

REVENDICATIONS

1. Séquence nucléotidique choisie dans le groupe comprenant SEQ ID N° 1,
5 SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6,
SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11,
SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N°
16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID
N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ
10 ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28.
2. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 1,
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une
mutation dans le gène *Krit1*.
15
3. Utilisation d'au moins une séquence nucléotidique selon la revendication 2,
pour la détection, à partir d'un prélèvement biologique, de la présence d'une
mutation dans le gène *Krit1* liée à la survenue de cavernomes.
- 20 4. Utilisation selon l'une des revendications 2 et 3, caractérisée en ce que la
détection de la mutation est effectuée dans au moins un exon du gène *Krit1*.
- 25 5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée par le fait qu'un couple de
séquences est spécifique d'un exon selon la répartition suivante :
- SEQ ID N° 1 / SEQ ID N° 2 pour l'exon 1,
- SEQ ID N° 3 / SEQ ID N° 4 pour l'exon 2,

16. Méthode de diagnostic selon la revendication 15, caractérisée par le fait que les amorces pour réaliser l'amplification sont parmi les séquences définies dans la revendication 1, de préférence dans la revendication 5.

5 17. Utilisation du gène *Krit1* ou d'une séquence dérivée de ce gène pour la préparation d'un médicament destiné à contrôler ou inhiber l'angiogenèse.

18. Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que le médicament est destiné à la thérapie génique.

10 19. Vecteur d'expression dans une cellule hôte appropriée, caractérisé en ce qu'il comporte la séquence du gène *Krit1* ou une séquence dérivée de ce gène.

15 20. Vecteur d'expression selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend les éléments nécessaires à la surexpression de la séquence.

21. Vecteur selon les revendications 19 ou 20, destiné à une utilisation selon l'une des revendications 17 et 18.

20 22. Vecteur selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisé en ce qu'il comporte une séquence assurant le ciblage et/ou l'expression tissu spécifique.

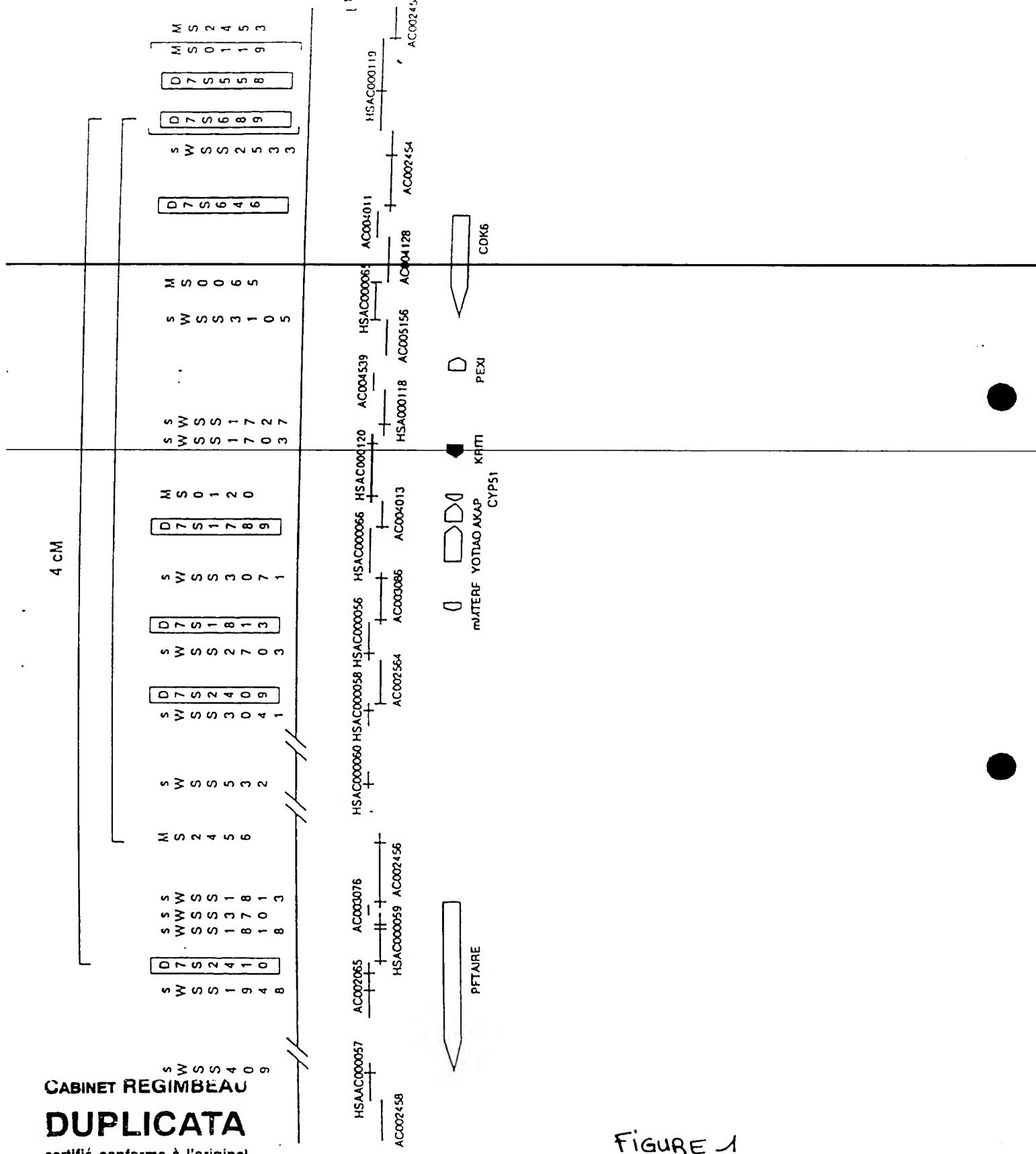
5355409
CABINET REGIMBEAU

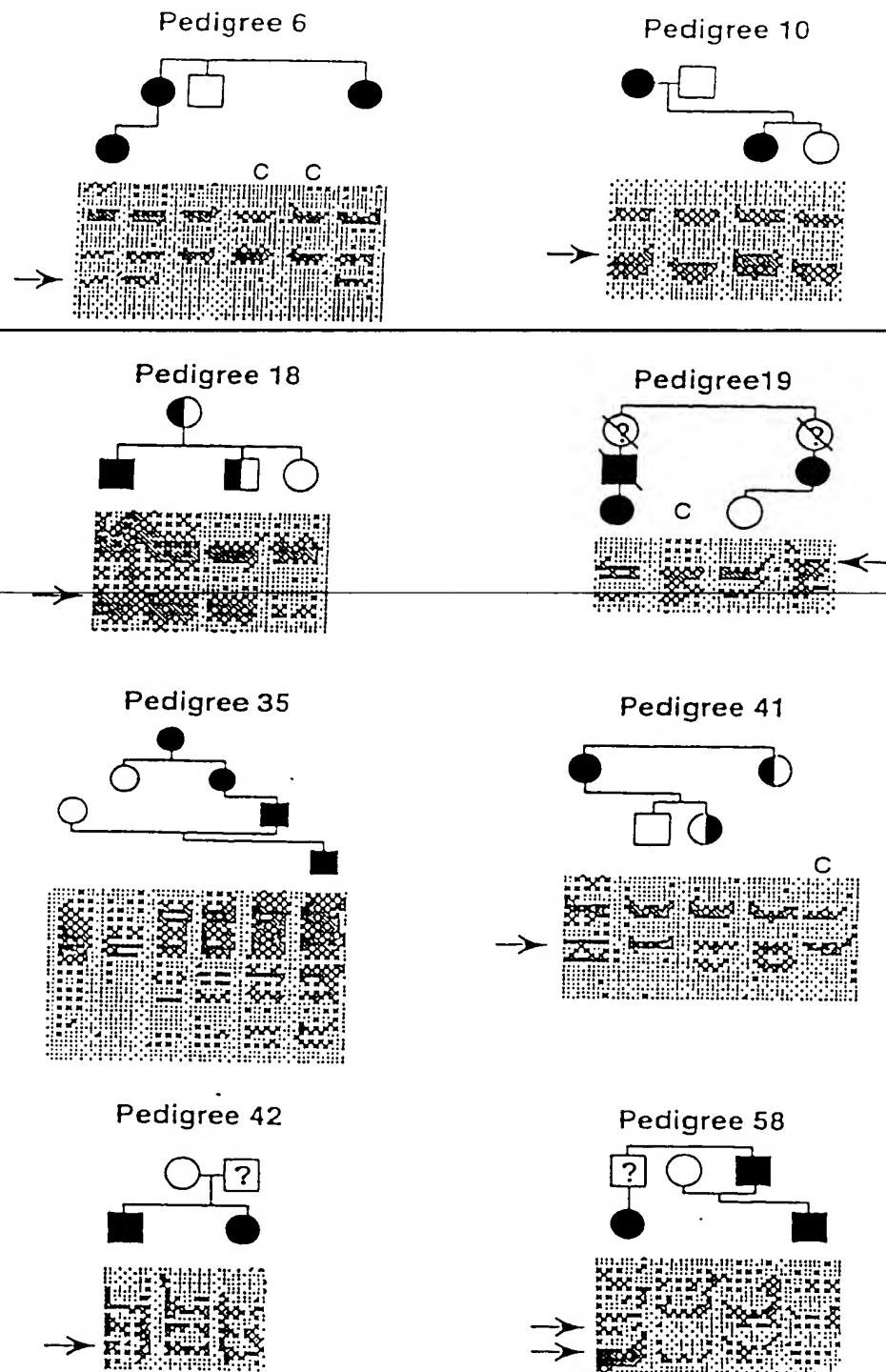
DUPLICATA

certifié conforme à l'original

4

FIGURE 1





CABINET REGIMBEAU
DUPLICATA
certifie une copie à l'original

FIGURE 2

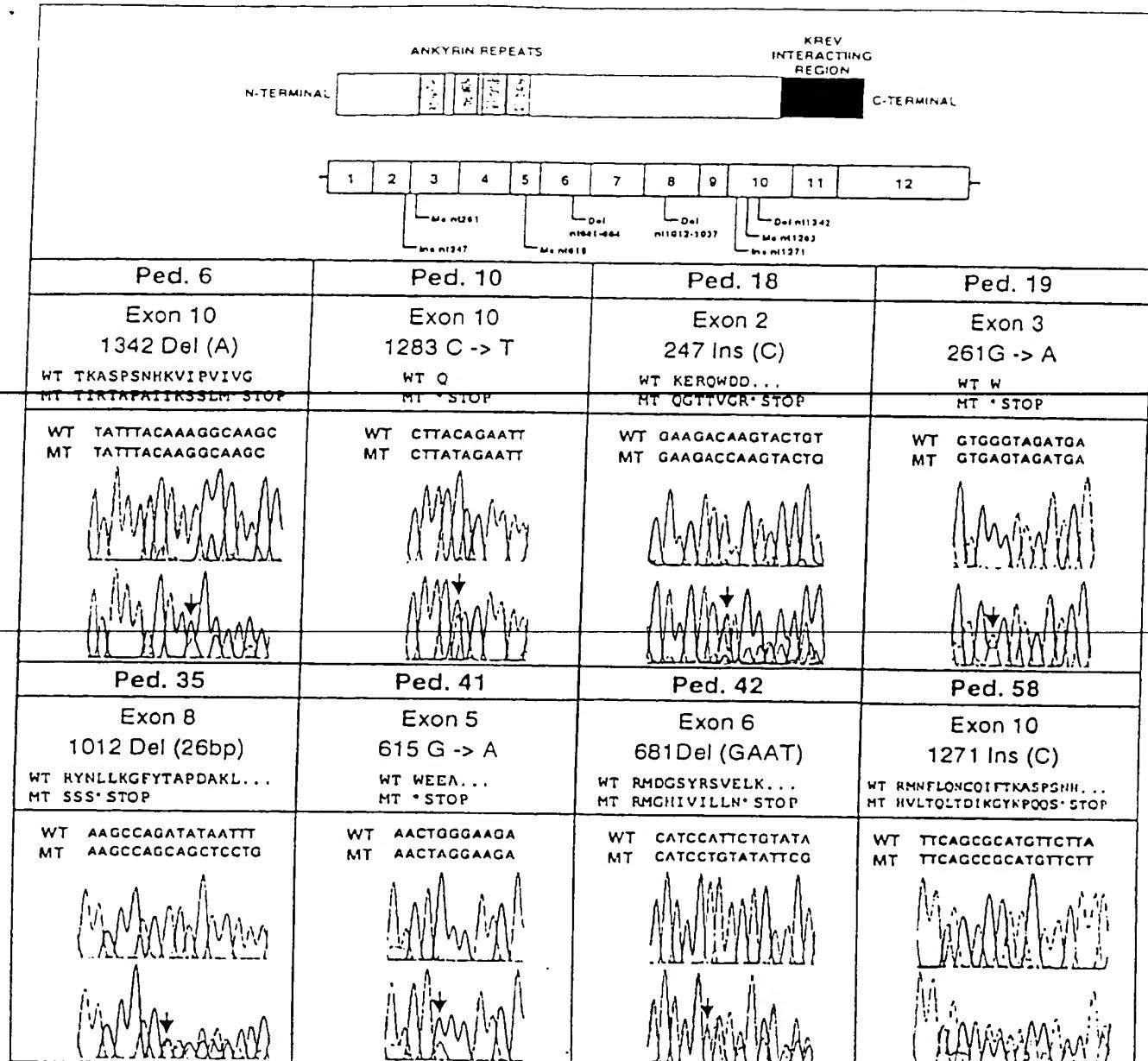


FIGURE 3

ANALYSE DES MUTATIONS
CONFIRMÉES
dans l'ADN confirmé à l'origine

